



TITLE:

STUDIES ON GLYCYL TRANSFER  
RNA SYNTHESIS IN POSTERIOR  
SILKGLAND OF THE SILKWORM(  
Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

Kurosawa, Shinichi

---

CITATION:

Kurosawa, Shinichi. STUDIES ON GLYCYL TRANSFER RNA SYNTHESIS IN POSTERIOR SILKGLAND OF THE SILKWORM. 京都大学, 1972, 農学博士

ISSUE DATE:

1972-03-23

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/213892>

RIGHT:

氏 名	黒 沢 辰 一 くろ さわ しん いち
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	農 博 第 145 号
学位授与の日付	昭 和 47 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	農 学 研 究 科 農 芸 化 学 専 攻
学位論文題目	<b>STUDIES ON GLYCYL TRANSFER RNA SYNTHESIS IN POSTERIOR SILKGLAND OF THE SILKWORM</b> (カイコ後部絹糸腺におけるグリシルtRNAの合成に関する研究)

論文調査委員 (主 査)  
教 授 小野寺幸之進 教 授 緒方浩一 教 授 柄倉辰六郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

たんぱく質生合成の初期段階はアミノ酸の活性化とそれにつづくアミノアシル tRNA の生成から成っている。この二つの反応は同一の酵素 (アミノアシル tRNA 合成酵素 EC 6.1.1) によって触媒され、それぞれのアミノ酸に対して特異的な酵素が少なくとも一種類存在すると考えられている。この酵素の関与する反応の様相と、一方、tRNA の構造および機能に対する相関性については不明の点が多い。本論文はたんぱく質生合成の初期段階におけるこれらの疑点を明らかにするため、カイコ後部絹糸腺におけるグリシン活性化反応とグリシル tRNA 合成反応に着目し、その過程を追求して得られた成果をまとめたものである。

5 齢期 5~6 日目のカイコから摘出して後部絹糸腺を磨碎し 105,000×g 上清を調製した。この画分について7種類のアミノ酸の活性化反応をしらべたところ、L-アラニン、I-ロイシンに対する活性が強く、グリシンに対しては L-アラニンの場合の約1/4であった。このことはアミノ酸活性化反応は、生合成されるフィブロインのアミノ酸組成と比例するものでなく、またアミノアシル tRNA 合成はそれぞれのアミノ酸に特異的な tRNA の量によって調節されることを示すものと考えられる。

つぎに 105,000×g 上清を硫酸分画したところ、45~70%画分にグリシル tRNA 合成活性の65%の活性の存在がみられた。この画分を DEAE-セルロースカラム上で10%グリセロール、0.01Mβ-メルカプトエタノールを含む 0.02M リン酸緩衝液中で KCl の直線濃度勾配溶液によって溶出分画し、それぞれの画分についてグリシン活性化に対応する ATP-<sup>32</sup>PPi 交換反応 (I)、および [<sup>14</sup>C]-グリシル tRNA 合成反応 (II) の活性を測定した。その結果、反応 I については活性のピークが二つ (ピーク A, B) 存在し、それらは MgCl<sub>2</sub> 依存性、至適 pH が異なることがわかった。また、反応 II についてもその活性に二つのピーク (ピーク a, b) が存在し、至適 pH が異なることがわかった。ピーク A 活性はピーク a および b 活性と重ならず、ピーク B 活性の一部分のみがピーク a および b 活性と重なった。そこでピーク A 画分とピーク b 画分の混合液を酵素液として反応 II を行なわせたところ、その反応は正常に進行した。し

たがってピーク A 画分に RNase が存在する可能性と、II の反応が完結するためにアミノ酸活性化酵素以外に他の因子を必要とする可能性はいずれも否定される。また、グリシン以外の物質が活性化されたという可能性も反応液の組成などの点から否定される。さらにアラニン対応 ATP-<sup>32</sup>PPi 交換反応のピークがピーク A および B と異なることがわかった。これらの事実からカイコ後部絹糸腺中にはグリシル tRNA 合成に関与せずグリシン活性化のみを行なう酵素が二種類存在することが明らかである。

一方、tRNA の縮重の問題については必ずしも一致した見解が出されていなかった。そこで、まず、カイコ後部絹糸腺から調製した tRNA 混合物から [<sup>14</sup>C]-グリシンで標識した tRNA をつくり、これを RNase T<sub>1</sub> で完全に消化し、DEAE-セルロースカラムで分画したところ [<sup>14</sup>C] のピークが二つ得られた。このことは 3'-末端 (acceptor end) に隣接する数個のヌクレオチド部分で、構造の異なったグリシン tRNA が少なくとも二種類存在することを示すものである。

そこで、この縮重の現象と反応 II との対応性をしらべるため、絹糸腺の全 tRNA を DEAE-セファデックスカラムで分画したところ、[<sup>14</sup>C]-グリシン受容活性として二つの大きいピーク (ピーク I, II) と小さいピーク (ピーク III) がえられた。アミノアシル化活性との関連性をしらべてみると、ピーク a はピーク I 画分をグリシル化し、ピーク b はピーク II 画分をそれぞれグリシル化し、ピーク III 画分はピーク a, b のいずれによってもグリシル化されないことが明らかとなった。このことは二種類のグリシン tRNA に対してそれぞれに対応するグリシル tRNA 合成酵素が存在することを示唆するものである。

#### 論文審査の結果の要旨

たんぱく質合成の初期段階は 1) Amino acid+ATP+Enzyme $\rightleftharpoons$ Enzyme-aminoacyl adenylate+PPi, 2) Enzyme-aminoacyl adenylate+tRNA $\rightleftharpoons$ Aminoacyl tRNA+Enzyme+AMP の二反応から成っている。この反応は aminoacyl tRNA synthetase または amino acid activating enzyme と呼ばれる同一酵素によって触媒され、それぞれのアミノ酸に特異的なこの酵素が存在するとされていたが、上記の反応と酵素との関連性、あるいはアミノ酸に特異的な tRNA との対応性などについてはほとんどわかっていなかった。本研究はこれらの点を追求するため、カイコを用いてたんぱく質合成の様相をしらべ、この分子生物学上の重要課題の一端を解明している。

著者はフィブロインの合成の場所であるカイコ後部絹糸腺からグリシン tRNA を単離して、その化学構造を探究し、3'-末端 (acceptor end) の数個のヌクレオチド構造が異なる二種類の分子が存在することを明らかにした。

つぎにカイコ後部絹糸腺の 105,000×g 上清を分画精製して、アミノ酸活性化反応とアミノアシル tRNA 合成反応について活性を測定した結果、それぞれの活性にピークが二つずつ存在することを証明した。これらの画分に相当する酵素は異なった性質をもち、また、前者の活性のうち一つのピークの一部だけが後者の活性と合致した。このことから、カイコ後部絹糸腺にはグリシル tRNA 合成を行わず、グリシン活性化反応だけを行なう酵素が二種類存在すると結論した。さらにグリシル tRNA 合成活性の二つのピークが二種類のグリシン tRNA に対応することを明らかにし、グリシン tRNA の縮重に対応して酵素活性にも縮重の現象が存在することを示唆した。

このように本研究はたんぱく質生成の初期段階の反応について新しい知見を得たもので、生物化学および分子生物学の分野に貢献するところが大きい。

よって、本論文は農学博士の学位論文として価値あるものと認める。